

TRABAJO DE FIN DE GRADO

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL COLESTEROL MEDIANTE DISTINTOS VEHÍCULOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN HEPG2

Effect of cholesterol administration by different vehicles on genetic expression
in HepG2

Autora:

Elena Contel Maza

Directores:

Jesús de la Osada García

Luis Vicente Herrera Marcos

Grado en Biotecnología/Departamento de Bioquímica,
Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria

Curso 2016-2017

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Antecedentes	2
Lipoproteínas de baja densidad, LDL	2
Aislamiento de LDL	2
Ultracentrifugación en gradiente de densidad	2
Cromatografía líquida rápida de proteínas, FPLC	3
Conservación de LDL	3
Criopreservación con sacarosa	3
Liofilización	4
Deslipidización	4
Vehiculización del colesterol	5
LDL	5
Etanol	5
Línea celular HepG2	5
Genes de estudio	6
CIDEA	6
ACOX1	6
PGC1α	6
Objetivos	7
Materiales y métodos	7
Aislamiento de LDL	7
Ultracentrifugación en gradiente de densidad	7
Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas, FPLC	7
Concentración de las muestras	8
Caracterización de las LDL aisladas	8
Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford	8
Determinación de la concentración de colesterol por fluorescencia	9
Conservación de las LDL aisladas	9
Criopreservación con sacarosa	9
Liofilización	10
Deslipidización parcial de las LDL y vehiculización del colesterol	10
Preparación de los medios y administración	11
Células HepG2	11
Preparación y administración de los medios con colesterol	12

Preparación de las muestras de cDNA	12
Extracción de RNA	12
Retrotranscripción	13
qPCR	14
Resultados y discusión	15
Aislamiento de LDL.....	15
Ultracentrifugación en gradiente de densidad	15
Cromatografía líquida rápida de proteínas, FPLC	15
Conservación de LDL a distintos tiempos.....	16
Deslipidización parcial de las LDL y vehiculización del colesterol.....	18
Tratamiento con colesterol de las células HepG2.....	19
<i>PGC1α</i>	21
<i>ACOX1</i> y <i>CIDEA</i>	21
Conclusiones	23
Conclusions	23
Bibliografía	24
Anexo	26
Secuencias de los cebadores de la QPCR en Tiempo Real	26

Abreviaturas

- Agua ADDE: agua miliQ autoclavada
- Agua DPEC: agua destilada y desionizada tratada con dietil pirocarbonato y autoclavada a 121 °C durante 1 h.
- ACOX1: Acyl-coenzyme A oxidase, acil-coenzima A oxidasa
- APOB: apolipoproteína B
- BSA: bovine serum albumin, albúmina sérica bovina
- CIDEc: cell death-inducing DFFA-like effector c, efector c inductor de muerte celular tipo DFFA
- CoA: coenzyme A, coenzima A
- DFFA: DNA Fragmentation Factor Subunit Alpha, subunidad α del factor de fragmentación del DNA
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography, cromatografía líquida rápida de proteínas
- FSP27: fat-specific protein 27, proteína específica de grasa 27
- Guías MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, información mínima para la publicación de experimentos de QPCR en Tiempo Real
- HDL: high-density lipoprotein, lipoproteína de alta densidad
- HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa
- HRP: horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano
- LDL: low-density lipoprotein, lipoproteína de baja densidad
- PBS: phosphate buffered saline, tampón fosfato salino
- PCR: Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa
- *PGC1 α* : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (coactivador 1- α del receptor gamma activado por proliferador del peroxisoma)
- qPCR: quantitative PCR, PCR cuantitativa
- SFB: suero fetal bovino
- VLDL: very low-density lipoprotein, lipoproteína de muy baja densidad

Resumen

Hoy en día los métodos principales de purificación de LDL plasmáticas son la ultracentrifugación en gradiente de densidad y la separación cromatográfica. En el presente trabajo se analizan las ventajas e inconvenientes de ambos, concluyendo que la separación cromatográfica presenta una serie de ventajas que la hacen más adecuada para los experimentos que se quieren realizar posteriormente con las preparaciones obtenidas.

Una vez obtenidas las preparaciones de LDL purificadas del plasma, es necesario conservarlas. Para ello también existen varios sistemas, siendo los más importantes la criopreservación con sacarosa y la liofilización. Ambos se valoran en este trabajo, no encontrando diferencias significativas en la calidad de la conservación. Se decide utilizar la liofilización para evitar el uso de sacarosa, la cual podría desencadenar respuestas inespecíficas en las células a tratar con las preparaciones de LDL.

Con las LDL aisladas por FPLC y posteriormente liofilizadas se hacen pruebas de deslipidización para eliminar los lípidos neutros, entre ellos el colesterol, de manera que puedan funcionar como vehículo de una cantidad conocida de colesterol a añadir. El protocolo utilizado no funciona y no se aprecian diferencias en la concentración de colesterol de las preparaciones tratadas y no tratadas.

Finalmente se estudia si la administración de colesterol vehiculizado en LDL o en etanol tiene algún efecto diferencial a las 4 y las 8 horas sobre la expresión de los genes *CIDEA* (relacionado con la formación de gotas lipídicas), *ACOX1* (codifica para la primera enzima de la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos) y *PGC1 α* (coactivador de factores de transcripción implicados en la regulación del metabolismo de energía) en las células HepG2.

Se aprecia sobreexpresión significativa de *PGC1 α* a las 4 horas en células tratadas con LDL con colesterol, mientras que pasadas 8 horas disminuye significativamente su expresión con respecto al control al tratar con colesterol vehiculizado por ambas vías. Por otro lado, se observa correlación en la expresión de *CIDEA* y *ACOX1*.

Abstract

Nowadays main methods for plasmatic LDL isolation are density gradient ultracentrifugation and chromatographic separation. In the present project advantages and disadvantages of both systems are analysed, concluding that chromatographic separation presents a series of advantages when compared to density gradient ultracentrifugation, making it more suitable to conduct the later experiments with the preparations obtained.

Once the purified plasmatic LDL preparations were isolated, it was necessary to preserve them until the resumption of the essays. In order to do so, there are also several systems available, of which cryopreservation with sucrose and lyophilization are the most important. Both methods are assessed in this project, with no finding of significant differences in isolated LDL conservation. Lyophilisation was chosen to conserve the samples to avoid the use of sucrose, which could trigger unspecific responses in the cells treated with the LDL preparations.

FPLC isolated and then lyophilized LDL are used to conduct delipidization essays, in order to remove neutral lipids, cholesterol included among them, so that they could work as a vehicle of a known quantity of cholesterol added afterwards. Delipidization protocol used does not work

and no differences are found between treated and control samples, presenting both of them very similar concentrations of cholesterol.

Finally, the effect of administration of cholesterol vehiculized by either LDL or ethanol is examined after 4 and 8 hours treatment on *CIDEA* (related to lipid droplets formation), *ACOX1* (gene of the first enzyme in peroxisomal fatty acids β -oxidation) and *PGC1 α* (coactivator of transcription factors involved in energetic metabolism regulation) expression in HepG2 cells.

Significant overexpression of *PGC1 α* after 4 hours treatment is detected when cholesterol vehiculized in LDL was administrated to cells, while after 8 hours treatment with cholesterol vehiculized in both, ethanol and LDL, significant decrease of its expression is observed in comparison with control. On the other hand, a correlation is observed in *CIDEA* and *ACOX1* expression.

Antecedentes

Lipoproteínas de baja densidad, LDL

Una LDL es una partícula esférica con un diámetro de 220 nm y una masa de aproximada de 3000 kDa. Cada partícula cuenta con un núcleo oleoso que contiene unas 1500 moléculas de colesterol esterificado (1). Estos ésteres de colesterol suponen aproximadamente la mitad de la masa de la lipoproteína (2). El núcleo está protegido del plasma acuoso por una capa hidrofílica compuesta por unas 800 moléculas de fosfolípidos, unas 500 de colesterol no esterificado y una molécula de aproximadamente 500 kDa: APOB100 (1). La densidad de estas lipopartículas se encuentra entre 1,063 y 1,019 g/ml (3).

Las LDL se secretan del hígado como partículas más grandes, las VLDL, que contienen triacilglicéridos y colesterol. Los triacilglicéridos son hidrolizados en el tejido adiposo y en el músculo principalmente, haciendo que la partícula se reduzca y se convierta en LDL. La mayoría de las LDL son retiradas de la circulación por receptores de LDL localizados en el hígado.

En el mecanismo de absorción de las LDL es clave un receptor de superficie que une APOB. Se ha demostrado que los receptores de LDL se agrupan en regiones de la superficie celular adaptadas para la internalización rápida por endocitosis: los hoyos revertidos. La LDL internalizada es dirigida al lisosoma, donde los ésteres de colesterol son hidrolizados y el colesterol es liberado para la síntesis de nuevas membranas (1).

Aislamiento de LDL

Las preparaciones de LDL son inestables y muy propensas a la oxidación durante el proceso de aislamiento, manejo y almacenamiento. Por tanto, la metodología de aislamiento de LDL del plasma para posteriores estudios es de gran importancia y determinará la obtención de una fracción de LDL con las características adecuadas (4).

Ultracentrifugación en gradiente de densidad

La ultracentrifugación analítica permite separar las lipoproteínas transportadoras de colesterol del plasma de acuerdo a su densidad (1).

Con el trabajo de Vieira et al. (4) se diseñó un protocolo en el cual se obtienen preparaciones a partir de una sola muestra, en poco tiempo, muy concentradas y libres de peróxidos y antioxidantes plasmáticos. La metodología incluye la modificación del método descrito por Chung et al. (5), utilizando una ultracentrífuga Beckman L80 equipada con un rotor 70.1 Ti de ángulo fijo. El aislamiento continúa con un paso de concentración mediante diálisis por ultrafiltración bajo corriente de nitrógeno. Este último paso optimiza la obtención de la fracción concentrada en LDL a partir de la muestra inicial. El proceso de aislamiento reduce el tiempo requerido para separar las LDL a 3 h y obtiene una preparación de LDL altamente purificada a las 4 h (4).

Sin embargo, se ha descrito que el aislamiento de LDL por el método de ultracentrifugación en gradiente de densidad puede disociar apolipoproteínas de la superficie de la partícula (6).

Cromatografía líquida rápida de proteínas, FPLC

El FPLC es una forma de cromatografía de alto rendimiento y alta resolución en la que se emplean fases estacionarias de pequeño diámetro. Se desarrolló originalmente para proteínas, y utiliza sistemas de alta capacidad de carga compatibles con sistemas tampón acuosos. Emplea un flujo rápido y existen fases estacionarias disponibles para poder aplicar los métodos de cromatografía más comunes (intercambio iónico, filtración en gel, fase reversa y afinidad). Mediante FPLC es posible llevar a cabo separaciones reproducibles gracias a un alto nivel de automatización, así como programas de control de gradiente y de recolección de picos. El método es aplicable a otros tipos de muestras biológicas además de proteínas, incluyendo oligonucleótidos y plásmidos. El tipo de experimento más común realizado por FPLC es el intercambio aniónico de proteínas (7).

De esta forma, mediante FPLC con columnas de exclusión es posible aislar proteínas partiendo de una mezcla compleja, separando los componentes de la muestra en función de su tamaño: las partículas mayores aparecen antes, mientras que las más pequeñas quedan retenidas durante más tiempo en la fase estacionaria. Es posible aplicar este método a la separación de LDL del suero.

Conservación de LDL

Un problema significativo en el estudio de la estructura y función de las LDL es la incapacidad de almacenar las preparaciones inalteradas durante largos periodos de tiempo. Las LDL sufren daño oxidativo y degradación en el curso de unos pocos días o semanas cuando se almacenan a 4 °C. Consecuentemente, a la hora de comparar las propiedades de fracciones de LDL recogidas a distintos tiempos, sería óptimo poder almacenarlas de manera que se evitara su modificación.

La congelación es un método ampliamente utilizado para la preservación de muestras biológicas; sin embargo, se sabe que las lipoproteínas del plasma se dañan por los procesos de congelación-descongelación (8).

Ya en los años 40, Cohn describió que “para ciertas lipoproteínas...la congelación parece debilitar la unión del lípido y la proteína” (9). Aunque las concentraciones del colesterol total y los triacilglicéridos del suero no parecen verse afectados, se encuentran cambios en fracciones individuales de lipoproteínas (8).

Criopreservación con sacarosa

En 1957 Lovelock (10) reseñó que la adición previa a la congelación de sacarosa a las lipoproteínas puede ayudar a evitar la pérdida de solubilidad relacionada con la congelación.

En el trabajo de Rumsey et al. (8) se pudo comprobar que la adición de un 10% de sacarosa (w/v) antes de la congelación puede evitar las alteraciones estructurales de las LDL, así como los cambios en su capacidad de unión a células. Además, estas mantienen propiedades físicas, químicas y biológicas similares a las de LDL recién extraídas, incluso tras 18 meses de almacenamiento.

Liofilización

La liofilización se considera el método de almacenamiento de elección para proteínas que son frágiles en solución. Con este sistema se consigue pasar de una formulación líquida a una en estado sólido, de manera que no solo mejora la estabilidad, sino que también facilita el manejo de las formulaciones (transporte y almacenamiento). Para aumentar la estabilidad de la proteína y protegerla de los estreses físico-químicos del proceso de liofilizado (cambios en la temperatura, presión, deshidratación, pH, etc.) se suelen añadir pequeñas moléculas como azúcares o polioles (alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilo) (11), (12).

Un proceso típico de liofilizado consiste en tres pasos: congelado, secado primario y secado secundario.

La congelación es un paso de desecación eficiente en el que la mayoría del solvente, normalmente agua, se separa de los solutos para formar hielo. La fase del soluto se va concentrando, hasta que al final de esta etapa contiene alrededor del 20 % de agua (w/w). Este primer paso suele abarcar varias horas.

Durante el secado primario, la presión de la cámara donde ocurre la liofilización está muy por debajo de la presión de vapor del hielo; el hielo se transfiere del producto al condensador por sublimación y cristalización sobre los platos o las espirales frías (< -50 °C) del mismo. Típicamente, este paso es el más largo.

Por último, durante el secado secundario el agua es desorbida desde el producto. Esto ocurre a una temperatura más elevada que en el secado primario y baja presión. En realidad, comienza a darse al principio del secado primario, cuando el hielo se retira de una región, pero el grueso de esta etapa ocurre cuando el secado primario ha concluido y la temperatura del producto ha aumentado. El secado transcurre durante unas horas (12).

Deslipidización

La extracción con solventes de las lipoproteínas del suero ha sido frecuentemente utilizada en estudios sobre la naturaleza química de las fracciones proteicas y de las fuerzas de unión entre lípidos y proteínas.

La extracción completa de lípidos únicamente se puede conseguir tras la retirada de las moléculas de agua, esenciales para la integridad estructural de las lipoproteínas. Esta deshidratación se puede conseguir mediante, o bien la adición de metanol o etanol, o bien liofilizando las muestras. La extracción de las lipoproteínas del suero mediante solventes orgánicos apolares sin deshidratación previa resulta en productos solo parcialmente deslipidizados.

Se puede mejorar la extracción con solventes apolares utilizando jabones o detergentes. El tratamiento de lipoproteínas con dietil éter en presencia de detergentes resulta en una eliminación notable de los triacilglicéridos y el colesterol, pero solo elimina parcialmente los fosfolípidos. Se cree que el detergente forma una micela detergente-lipoproteína, permitiendo que el dimetil éter se adentre más en la lipoproteína y favoreciendo así una extracción más completa de los lípidos.

Con el trabajo de Gustafson et al. se desarrolló un método que proporcionaba mejores rendimientos de residuos de lípido-proteína solubles en agua de composición reproducible entre distintas extracciones. Para eliminar los lípidos neutros de manera preferente y mantener los residuos de fosfolípidos-proteína en forma soluble sin utilizar detergentes, en este método las lipoproteínas se liofilizan en presencia de almidón como agente protector y se extraen con n-heptano (solvente apolar) (13).

Vehiculización del colesterol

LDL

Una vez extraídos los lípidos neutros de las LDL plasmáticas con heptano, estos pueden ser reemplazados por ésteres de colesterol exógenos o por otros ésteres de ácidos grasos de cadena larga, incluyendo triacilglicéridos y ésteres metilo. Así, estas moléculas pueden utilizarse para reconstituir el núcleo de las LDL tratadas con heptano.

El requerimiento estructural para una incorporación eficaz de esta clase de ésteres a las LDL es la presencia de un doble enlace *cis* en la cadena del ácido graso. De esta forma es posible alcanzar un ratio de masa de lípido-proteína >1 al añadir por ejemplo oleato de colesterol, trioleína o metil oleato. La incorporación preferente del tipo de moléculas descrito a las LDL sugiere que el componente fosfolipídico o proteico de estas lipopartículas presenta cierta especificidad para interactuar con hidrocarburos de cadena larga que contengan uno o más dobles enlaces.

Las preparaciones de LDL reconstituidas mantienen la capacidad de unirse al receptor de LDL de los fibroblastos humanos y por tanto de descargar sus respectivos núcleos lipídicos en las células, desencadenando los mismos mecanismos que se dan cuando se incuban LDL nativas con fibroblastos. Así, se puede hacer funcionar las LDL plasmáticas como transportadores de gran variedad de compuestos hidrofóbicos (2).

Etanol

El etanol es el vehículo más comúnmente utilizado para estudios *in vitro* en los que se administra colesterol a células (14). De esta forma, tradicionalmente el colesterol se añade suplementando el medio de cultivo celular con una solución concentrada de colesterol y otros compuestos insolubles en agua disueltos en etanol. Sin embargo, la solubilidad del colesterol en etanol es limitada y para procesos que requieran gran cantidad de colesterol, el incremento consecuente de etanol a añadir puede impactar negativamente sobre el crecimiento de las células (15).

En general se acepta que el etanol interacciona tanto con las proteínas, como con los lípidos de membrana (16).

Línea celular HepG2

La línea celular HepG2 deriva de una biopsia de hígado de un niño caucásico con hepatoblastoma; fue aislada por D. Alden y B. Knowles en 1979 (17). Es un modelo de estudio *in vitro* comúnmente utilizado al conservar gran parte de las funciones celulares de los hepatocitos normales, tales como la expresión de receptores de superficie específicos y la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas (18). Además de para el estudio del tráfico de proteínas a nivel intracelular y de lípidos hepáticos humanos, también se utiliza para evaluar compuestos que puedan afectar positiva o negativamente al metabolismo hepático.

El crecimiento de esta línea celular es de tipo epitelial adherente, con morfología poligonal aplastada. La organización celular se caracteriza por tener un aparato de Golgi y un Retículo Endoplásmico muy desarrollados. Crecen en monocapas que se van superponiendo conforme la confluencia aumenta (19).

Genes de estudio

CIDEA

También llamado *FSP27*, codifica para una proteína (*FSP27*) asociada a gotas lipídicas que, cuando se sobreexpresa, hace que la velocidad de la oxidación de los ácidos grasos disminuya.

El mRNA de *FSP27* se ha detectado en el hígado graso, donde se acumula el exceso de lípidos y se forman grandes gotas de grasa. Se cree que la expresión de este gen puede promover la formación de las gotas lipídicas en los hepatocitos. La expresión forzada de *FSP27* en este tipo de células reduce significativamente la actividad de la β -oxidación mitocondrial, mientras que el ayuno intermitente a largo plazo induce *FSP27* en el tejido adiposo blanco (20).

ACOX1

ACOX1, codificada por el gen *ACOX1*, es la primera enzima que interviene en la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos, catalizando la desaturación de acil-CoAs a 2-trans-enoil-CoAs y produciendo peróxido de hidrógeno. Este paso es el limitante de velocidad del proceso. En la β -oxidación de los ácidos grasos en el peroxisoma se oxidan ácidos grasos de cadena muy larga o de tamaño medio. *ACOX1* juega un papel clave en el metabolismo de los ácidos grasos y en el depósito de grasa (21).

PGC1 α

PGC-1 α es un coactivador potente de una gran cantidad de factores de transcripción relacionados con la expedición de energía de todo el cuerpo. Ha sido descrito como un regulador clave del programa transcripcional que gobierna el metabolismo de energía. Su actividad no es constante y puede ser finamente modulada en respuesta a distintas situaciones metabólicas o también de manera tejido-específica.

Se expresa principalmente en tejidos con gran capacidad energética oxidativa, como el corazón, el músculo esquelético, el hígado, el tejido adiposo pardo o el cerebro, y se induce fuertemente en condiciones que requieren energía, como el frío, el ayuno y el ejercicio.

PGC-1 α incrementa de manera coordinada la velocidad de la biogénesis mitocondrial y la respiración (aumenta la expresión de enzimas de la cadena de transporte electrónico), así como la captación y el uso de sustratos para la producción de energía. Además, controla la expresión de muchos genes relacionados con la oxidación de los lípidos (22), (23).

Objetivos

Este trabajo tiene varios objetivos. El primero de ellos va a ser optimizar un protocolo de aislamiento y conservación de LDL. Para ello se valorarán los principales métodos de aislamiento actuales, que son la ultracentrifugación en gradiente de densidad y la separación cromatográfica, así como los sistemas de conservación más importantes: la liofilización y la criopreservación en solución de sacarosa.

El segundo objetivo va a ser optimizar un protocolo de deslipidización parcial (eliminación de los lípidos) de las LDL, de manera que puedan vehicular una cantidad conocida de colesterol. Como vehículo alternativo se empleará etanol.

Se probarán ambos métodos de vehiculización para administrar colesterol a las células HepG2, y finalmente se estudiará el efecto de cada vía de administración sobre la expresión a distintos tiempos de los genes *CIDEA*, *ACOX* y *PGC1 α* en dichas células.

Materiales y métodos

Aislamiento de LDL

El primer paso del trabajo fue aislar las LDL del plasma, de manera que se pudieran utilizar como vehículo para transportar colesterol. Se trabajó con alícuotas de plasma de cerdo y para la extracción de LDL se evaluaron dos métodos:

Ultracentrifugación en gradiente de densidad

Partiendo de 10 ml de plasma, se siguió el protocolo diseñado por Vieira et al. (4) variando algunos pasos y añadiendo un tratamiento con carbón activo al 1%. Para este tratamiento se dejó incubar la mezcla del plasma con carbón activo 1 h a 37°C, seguidamente se centrifugó a 8 °C 5 min a 1500 g y finalmente se filtró con papel Whatman. El volumen de plasma recuperado tras el tratamiento fue de 5 ml. Aprovechando la capacidad del carbón activo de absorber los lípidos se pretendía facilitar la eliminación del colesterol, de manera que la deslipidización posterior fuera más sencilla.

Se añadió EDTA a concentración final 1 mM y a continuación se ajustó la densidad del plasma con KBr a 1,21 g/ml. Se prepararon 6 tubos de ultracentrífuga de 4,5 ml, cada uno de ellos con 1,34 ml de plasma preparado como se ha descrito y 3,16 ml de PBS. La ultracentrifugación se dejó transcurrir a 93000 rpm durante 3 h y 20 min a 15 °C (Beckman Optima TLX Ultracentrifuge; rotor TLA 110).

Pasado ese tiempo se recogieron y juntaron las fracciones correspondientes a las LDL, descartando la capa superior correspondiente a las VLDL y los quilomicrones. La preparación de LDL se protegió de la luz con papel de aluminio y con atmósfera de N₂ para evitar la oxidación y se mantuvo a -4 °C.

Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas, FPLC

El FPLC fue el otro método de aislamiento de lipoproteínas a evaluar. Para la extracción se partió de una alícuota de plasma de cerdo de la que se tomaron 300 µl. Se diluyó 1:2 con PBS para

cargarla en la columna de Superosa 6B (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), pinchando un total de 600 μ l.

Se utilizó tampón PBS, tanto para el equilibrado de la columna, como para la elución de las proteínas, y tampón PBS con azida al 0,15% para el lavado posterior de la columna (evita la contaminación por microorganismos).

Se eluyó a un flujo de 0,3 ml/min y se fueron recuperando fracciones de 0,5 ml. Conforme avanzaba la elución se pudo seguir el espectro de absorbancia a 280 nm en el cromatograma del ordenador, en el que aparecen los picos correspondientes a las proteínas contenidas en la muestra cargada separadas por tamaño. La elución tuvo lugar durante aproximadamente 2 horas.

En este tipo de cromatografía, el orden de elución de las lipoproteínas del suero (de menor a mayor tamaño) es el siguiente: quilomicrones, VLDL, LDL y HDL. Este último pico es mayor debido a que las HDL tienen el mismo tamaño que la albúmina y por tanto eluyen a la vez.

Las fracciones recuperadas que según el cromatograma correspondían a las LDL se juntaron en un eppendorf y se conservaron a 4 °C protegidas de la luz y con atmósfera de N₂.

Concentración de las muestras

A lo largo de este trabajo fue necesario en varias ocasiones concentrar muestras o retirar compuestos presentes en las mismas que podían resultar perjudiciales o interferir en experimentos posteriores.

Esto se realizó por centrifugación a 4 °C con los filtros Ultra 2 ml Amicon (EMD Millipore, división de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Además de concentrar las muestras, estos filtros permiten separar las sales de las proteínas de interés. Es especialmente importante en el caso de preparaciones obtenidas por ultracentrifugación, que contienen KBr (añadido para ajustar la densidad).

El procedimiento general para todas las muestras que fue necesario concentrar, fue el siguiente: los filtros se lavaron con agua ADDE centrifugando a 4000 g 10 min. Después se añadieron 2 ml de la muestra a cada uno y se centrifugó 12 minutos a 7000 g (en caso de no poder añadir toda la muestra de una vez, se repitió este paso tantas veces como fue necesario; si por el contrario, no había suficiente muestra para llegar a los 2 ml, se completó el volumen con PBS). Se descartó el líquido filtrado y finalmente se hizo un spin de 30 s de manera que la preparación de LDL concentrada cayera al cono que actúa como colector final.

Caracterización de las LDL aisladas

Una vez aisladas las LDL hubo que caracterizarlas, para posteriormente poder comparar las preparaciones obtenidas por los dos métodos de aislamiento descritos y elegir uno de ellos para continuar los experimentos.

Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford

En una placa Sarstedt (Nümbrecht, Alemania) de 96 pocillos se cargaron 2 μ l por triplicado de la muestra a analizar diluida 1:2, 1:5 y 1:10, así como un triplicado de la muestra sin diluir. La recta de calibrado se cargó por duplicado (2 μ l por pocillo), utilizando los puntos de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 μ g de BSA/ml.

A cada uno de los pocillos se añadieron 100 µl de reactivo de Bradford BioRad protein assay diluido 1:5. Dicho reactivo contiene azul de Coomassie, un colorante que se une específicamente a las proteínas. La reacción se dejaba transcurrir durante 10 minutos (opcionalmente se puede agitar en un orbital de placas para favorecer el desarrollo del color) y finalmente se medía la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

Determinación de la concentración de colesterol por fluorescencia

Para la determinación de la concentración de colesterol se utilizó el kit Amplex Red Reagent Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Dicho kit contiene los siguientes reactivos: agua ADDE, Amplex Red Reagent, HRP, buffer de reacción 5X, colesterol oxidasa y colesterol esterasa. Como recta de calibrado se utilizaron soluciones de las siguientes concentraciones de colesterol: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 y 0 µM.

Los ensayos se preparaban en placas Sarstedt (Nümbrecht, Alemania) de 96 pocillos, cargando 50 µl de cada muestra a analizar y de cada punto de la recta de calibrado, por duplicado. A cada pocillo se le añadieron 50 µl de la mezcla de reacción descrita en la tabla, dejando transcurrir la reacción 30 min a 37 °C.

Mezcla de reacción para 34 pocillos	
Amplex Red Reagent	37,5 µl
HRP	25 µl
Colesterol oxidasa	25 µl
Colesterol esterasa	2,5 µl
Buffer 1X	2,41 ml

Finalmente se analizaba la fluorescencia en el equipo FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania), excitando a 530-560 nm y valorando la emisión a 590 nm.

Conservación de las LDL aisladas

Por las razones que se describen en el apartado “Aislamiento de LDL” de la sección “Resultados y discusión”, la técnica de aislamiento de LDL elegida para continuar con los experimentos fue la separación cromatográfica por FPLC. Una vez tomada esta decisión, fue necesario elegir una técnica para conservar las preparaciones de LDL manteniendo sus propiedades durante el mayor tiempo posible.

Se hicieron tres separaciones más por FPLC, esta vez cargando directamente 2 ml de plasma de cerdo sin diluir en la columna de Superosa 6B. Se midió la concentración de proteína por el método de Bradford de las preparaciones de LDL obtenidas con estas separaciones, y se prepararon alícuotas de 700 µg. Algunas de estas alícuotas fueron utilizadas para realizar ensayos de conservación a distintos tiempos con los dos métodos que se describen a continuación:

Criopreservación con sacarosa

Para este método de conservación se siguió el protocolo descrito por Rumsey et al. (8). A cada alícuota de LDL sobre la que se iba a ensayar este método se le añadió una solución de sacarosa (50% de sacarosa, NaCl 150 mM y EDTA 0'24 mM, pH 7'4), de manera que la concentración final de sacarosa en la muestra fuera del 10%. Las alícuotas con sacarosa se almacenaron a -80°C.

La integridad de las LDL conservadas con este método se analizó a las 48 h, pasada una semana y pasado un mes. Para ello se volvieron a cargar en el FPLC para comparar el perfil con el de las LDL recién extraídas, habiendo retirado previamente la sacarosa por el método de concentración por centrifugación descrito en el apartado “Concentración de las muestras” de esta misma sección.

Liofilización

A las alícuotas de 700 µg de proteína sobre las que se iba a ensayar el método se les añadió almidón en una proporción 12:1 almidón-proteína (w/w), siguiendo el protocolo de Brown MS et al. (2). Esta macromolécula funciona como agente protector y estabilizante durante el proceso de liofilizado.

Una vez liofilizadas, las alícuotas se almacenaron a -20 °C.

La integridad de las LDL conservadas con este método se analizó a las 48 h, a la semana y pasado un mes. Para ello se reconstituyeron por incubación con 1,5 ml de tricina 10 mM (pH 8,4) durante 12 h a 4 °C. Posteriormente hubo que eliminar este compuesto por el método de concentración por centrifugación, de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Las muestras reconstituidas y ya sin tricina se volvieron a cargar en el FPLC para comparar el perfil con el de las LDL recién extraídas.

Deslipidización parcial de las LDL y vehiculización del colesterol

Analizando los perfiles obtenidos en el FPLC al recuperar las muestras conservadas por cada uno de los dos métodos descritos, se decidió que la liofilización presentaba una serie de ventajas respecto a la criopreservación con sacarosa, tal y como se describe en la sección “Resultados y discusión”. Así, los siguientes experimentos se realizaron partiendo de alícuotas de 700 µg de LDL aisladas por FPLC y conservadas a -20 °C tras la liofilización.

El siguiente objetivo fue conseguir la deslipidización parcial de las LDL, optimizando el protocolo descrito por Gustafson et al. (13) para la eliminación de los lípidos neutros. De esta forma se eliminaría el colesterol de las LDL aisladas y estas podrían actuar como vehículo de una cantidad conocida de colesterol exógeno, tal y como indica el protocolo de Brown MS et al (2).

Se hicieron varias pruebas variando ligeramente las condiciones para tratar de adaptar el proceso a nuestras instalaciones. En general, lo que se hizo fue añadir distintos volúmenes de n-heptano (PanReac AppliChem) para resuspender las LDL liofilizadas, incubar a -10 °C en agitación durante distintos tiempos, centrifugar suavemente 10 min, descartar el sobrenadante y volver a añadir heptano, repitiendo el ciclo de lavado varias veces. Con esto habríamos conseguido muestras parcialmente deslipidizadas.

Tras la deslipidación se incorporó oleato de colesterol a las LDL, con la intención de que estas lo captaran tras haber eliminado al menos parte de su colesterol endógeno.

El paso final de todas las pruebas consistió en secar los restos de heptano en corriente de nitrógeno y añadir 1,5 ml de tricina para reconstituir las LDL liofilizadas, conservándolas a -4 °C durante al menos 12 h, tras las cuales se recuperaban con el método de concentración por centrifugación.

Estas fueron las variaciones que se hicieron en cada prueba realizada:

Primera prueba

Se añadieron 40 ml de heptano y se dejaron incubar 1 h en agitación a -10 °C. Tras los 10 min de centrifugación suave (a 3000 g) se descartó el sobrenadante, finalizando así el primer ciclo de lavado. Se añadieron otros 40 ml de heptano, dejándolo incubar esta vez 20 min en agitación a -10 °C y se volvió a centrifugar de la misma manera. En total se hicieron 3 ciclos de lavado, el primero de ellos incubando una hora con heptano y los dos siguientes con incubación de 20 min.

Tras el último ciclo de lavado la alícuota de LDL se dividió en dos viales y a uno de ellos se le añadieron 4 mg de oleato de colesterol a partir de una solución a 20 mg/ml, dejándolo incubar durante 1 h a -20 °C.

Segunda prueba

Esta vez en cada lavado se añadieron 10 ml de heptano atemperado a -20 °C. La primera incubación se dejó durante 30 min y las siguientes durante 20 min. Se hicieron un total de 4 ciclos de lavado.

Tras los lavados se añadieron 4 mg de oleato de colesterol a la alícuota completa, sin dividirla en dos. Se dejó incubando 5 horas a -10 °C en agitación.

Tercera prueba

Se siguió el mismo procedimiento que en la segunda prueba pero tras los lavados, la muestra se dividió en dos viales: a uno de ellos se le incorporaron 4 mg de oleato de colesterol y al otro 200 µl de heptano.

Cuarta prueba

Se hicieron 4 ciclos de lavado con dos alícuotas de LDL liofilizadas a la vez, con las mismas condiciones que en la segunda y la tercera prueba, pero aumentando la velocidad de centrifugación a 3500 g.

Tras los lavados, a una de las alícuotas se le añadieron 4 mg de colesterol y a la otra no (control negativo).

Al día siguiente de cada prueba realizada, tras el paso de concentración de las muestras, se midió por el método de Bradford la concentración de proteína recuperada y se determinó la concentración de colesterol total de cada muestra por fluorescencia.

Tal y como se ha mencionado en los objetivos, también se quiso estudiar el efecto de la administración de colesterol a las células HepG2 vehiculizado en etanol. El procedimiento se explica en el siguiente apartado.

Preparación de los medios y administración

Células HepG2

Las células HepG2 se mantuvieron en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37 °C en botellas de 25 cm² y se crecieron en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific), suplementado con 10 % de suero SFB, aminoácidos no esenciales al 1 %, penicilina (1000 U/ml) al 1 %, estreptomicina (1000 µg/ml) al 1 % y anfotericina (250 U/ml) al 1 %.

Los cambios de pasaje se realizaron utilizando tripsina 0,25 % - EDTA 1 mM, cuando la confluencia del cultivo era cercana al 100 %. Primero se retiraba el medio de cultivo con una bomba de vacío y se lavaba con PBS para retirar el SFB (inactiva la tripsina). Se incubaban las botellas en estufa a 37 °C 5 min y se añadían 5 ml de medio de cultivo para resuspender las células, recogiénolas posteriormente en un falcon que se centrifugaba a 3500 g 5 minutos. Tras ese tiempo se retiraba el sobrenadante y se añadían 5 ml de medio para resuspender el pellet celular. Para realizar los ensayos de vehiculización del colesterol, las células se sembraron en placas de 6 pocillos.

El manejo de las células se hizo siempre en condiciones de esterilidad, trabajando en campana de flujo laminar con material estéril y desinfectando la superficie con etanol al 70 %.

Preparación y administración de los medios con colesterol

El día previo al tratamiento con colesterol, se cambió el medio de cultivo de las células a un medio de arresto con el que se creaban condiciones de ayuno. Dicho medio contenía 1/3 de DMEM con glucosa 8,3 mM, 2 % de glutamina, 0,4 % de SFB, 1 % de antibiótico y el resto del volumen a preparar se completó con DMEM sin glucosa. Las células se mantuvieron en el medio de arresto 24 horas.

El día de inicio del tratamiento se procedió a la elaboración de los medios con los distintos vehículos de colesterol a ensayar. La concentración final de colesterol en todos ellos debía ser de 250 nM. Por otro lado también hubo que preparar medios control sin colesterol.

Tal y como se explica en la sección “Resultados y discusión”, no fue posible eliminar el colesterol de las LDL con el protocolo de deslipidización ensayado, por lo que no se pudo elaborar un medio control de LDL sin colesterol y hubo que emplear el mismo control negativo que para el tratamiento con colesterol vehiculizado en etanol. Así, se prepararon en total 3 medios de cultivo:

- Para el tratamiento con colesterol vehiculizado en etanol al 0,25 %:
 - Medio con etanol al 0,25 % y colesterol 250 nM en medio DMEM sin glucosa
 - Control negativo: medio con etanol al 0,25 % en medio DMEM sin glucosa
- Para el tratamiento con colesterol vehiculizado en LDL:
 - Medio con LDL deslipidizadas a las que se les habían añadido 4 mg de oleato de colesterol en medio DMEM sin glucosa, quedando una concentración de colesterol de 250 nM
 - Control negativo: el mismo que para el tratamiento con colesterol vehiculizado en etanol.

La idea era ensayar cada una de las condiciones recogiendo muestras de células tratadas con cada medio a dos tiempos: a las 4 y a las 8 horas.

Antes de añadir el medio de tratamiento a los pocillos correspondientes se retiró el medio de arresto con una bomba de vacío y se lavaron con PBS. Seguidamente se añadió el medio de tratamiento deseado a cada pocillo y se dejó que las células respondieran a él durante el tiempo establecido.

Preparación de las muestras de cDNA

Pasado el tiempo de incubación con cada medio de tratamiento se procedió a la recogida de las células para analizar la expresión diferencial de los genes *CIDEA*, *ACOX* y *PGC1α*. Para ello se retiró el medio y se añadió RNA Lysis Buffer, incluido en el kit *Quick-RNA* MiniPrep (Zymo Research). En concreto se añadieron 580 µl de este tampón a cada pocillo, se lavó con este volumen y luego se transfirió el contenido del pocillo a un tubo Eppendorf etiquetado con el nombre de la muestra. Las muestras recogidas se almacenaron a -20 °C hasta continuar con la extracción.

Extracción de RNA

Para la extracción del RNA de las muestras se siguió el protocolo incluido en el kit *Quick-RNA* Miniprep (Zymo Research).

En primer lugar el lisado celular se centrifugó a 13500 g 1 min (todas las centrifugaciones se hicieron a esa velocidad). El sobrenadante se transfirió al filtro Spin-Awat Filter posicionado

sobre un tubo colector, ambos incluidos en el kit, y se volvió a centrifugar de la misma manera. Esta vez se siguió trabajando con lo que había atravesado el filtro, añadiendo el mismo volumen de etanol 100 % de manera que quedara en proporción 1:1. Esto se mezcló y luego se transfirió al filtro Zymo-Spin IIICG Column posicionado sobre otro tubo colector, ambos también incluidos en el kit. Se centrifugó 30 s y se descartó lo que había atravesado el filtro.

Luego se hizo un tratamiento con Dnasa para eliminar los restos de DNA. Para ello se lavó la columna con 400 µl de RNA Wash Buffer incluido en el kit y se centrifugó 30 s. Lo que atravesó el filtro se descartó. Seguidamente se preparó la mezcla de reacción con Dnasa: para cada muestra se añaden 5 µl de Dnase I y 75 µl de DNA Digestion Buffer (incluidos en el kit). A cada muestra a tratar se le añadieron 80 µl de la mezcla, directamente sobre la matriz de la columna que la contiene, y se centrifugó 30 s.

Seguidamente se añadieron 400 µl de RNA Prep Buffer del kit a la columna, centrifugando 30 s y descartando lo que atravesaba el filtro. Luego se añadieron 700 µl de RNA Wash Buffer y se hizo lo mismo. A continuación se añadieron 400 µl de RNA Wash Buffer y se centrifugó 2 minutos para asegurar que todo el buffer atravesaba el filtro y lavaba correctamente la muestra.

Finalmente la columna se posicionó sobre el Eppendorf en el que se quería recoger el RNA extraído y se añadieron 50 µl de Dnase/Rnase-Free Water provista en el kit, centrifugando 30 s. Este paso se realizó dos veces.

Tras la extracción se analizó la pureza, la integridad y la cantidad del RNA extraído. La pureza y la cantidad pudieron medirse con el equipo SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania), midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. El máximo de absorbancia del RNA es de 260 nm, medida con la que se pudo calcular la concentración en ng/µl. La pureza se comprueba calculando el ratio A260/A280, que debe encontrarse alrededor de 1,8 (a 280 nm se encuentra el máximo de absorbancia de las proteínas, posible contaminación del RNA).

Para comprobar la integridad, se cargó RNA en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, Merk) al 1 %, dejándolo correr 30 min a 80 V. Tras la electroforesis se visualizó el gel en el transiluminador Gel Doc™ XR (BioRad) esperando ver las dos bandas correspondientes al rRNA 28S y 18S.

Retrotranscripción

Una vez extraído y analizado el RNA se hizo la retrotranscripción para sintetizar el cDNA, utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Para cada muestra se tomaron 0,5 µg de RNA y se añadió 1 µl a cada muestra de una mezcla cebadores preparada con random hexamer primers y oligo dT en proporción 1:1. Los random hexamer primers son oligonucleótidos que hibridan en secuencias al azar, mientras que los oligo dT permiten amplificar únicamente el mRNA, que es el que contiene la cola de poliA en 3' con la que hibrida este cebador. El volumen se completó hasta los 11 µl con agua DEPEC. Se incubó a 65 °C 5 min para que se desnaturalizara el RNA y los primers pudieran hibridar en la secuencia correspondiente.

Después se añadieron 9 µl de una mezcla de reacción que contenía para cada muestra: 4 µl de 5X Reaction Buffer, 1 µl de inhibidor de RNAsas RiboLock (20 U/ µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix, 2 µl de retrotranscriptasa reversa M-MuLV (20 U/ µl). Se mezcló y se incubó a 25 °C durante 5 min, seguido de 1 h a 37 °C. Finalmente, para terminar la reacción se calentó a 70 °C 5 min.

qPCR

Una vez sintetizado el cDNA, este puede ser utilizado como molde en la qPCR en Tiempo Real (Real Time).

La técnica se aplicó a todas las muestras extraídas tras el tratamiento con los medios descritos en el apartado “Preparación de los medios y administración”, para analizar la expresión diferencial de los genes *CIDEA*, *ACOX* y *PGC1 α* .

La qPCR en Tiempo Real se fundamenta en el uso de fluorocromos que se intercalan en la cadena del cDNA, emitiendo una cantidad de fluorescencia que será mayor cuantas más copias del fragmento haya en el medio de reacción, en relación directamente proporcional a esto. El fluoróforo utilizado fue SYBRGreen, una molécula que se intercala en la doble hebra del DNA y emite fluorescencia cuando esta se desnaturaliza por los ciclos de calentamiento.

La cuantificación de la expresión de los genes de interés se puede hacer comparando con la expresión de un gen constitutivo como *PP1B*, el que se eligió en este caso.

Se cargó 1 μ l del cDNA de cada muestra por duplicado en una placa de MicroAmp Fast Optical 96-Well (Applied Biosystems), así como 1 μ l por duplicado de agua como control negativo. A cada pocillo cargado se le añadieron 11,5 μ l de una mezcla que contenía 6,25 μ l de Master Mix de Power SYBR (Applied Biosystems, San Francisco, EEUU), 0,5 μ l de los cebadores correspondientes al gen a analizar (0,25 μ l de cada uno, 100 nM; secuencias incluidas en la sección “Anexo”) y 4,75 μ l de agua DPEC por cada muestra.

Se utilizó el termociclador StepOne (Applied Biosystems). Este lleva a cabo las siguientes etapas: 95 °C 20 s para activar los reactivos y desnaturalizar el cDNA, 40 ciclos de 95 °C 3 s y 60 °C 30 s (la temperatura de esta etapa se modifica según la temperatura óptima de los cebadores utilizados). Tras completarse todos los ciclos se obtuvo la curva de Melting, con la que se pudo comprobar la correcta amplificación y si se han obtenido uno o más productos de amplificación (solo debería haber uno).

El sistema Step One proporcionó el valor de C_T de cada muestra, es decir, el ciclo en el que comienza la emisión significativa de fluorescencia para cada una. Con este valor se pudo determinar cuantitativamente la expresión diferencial de cada gen.

El análisis matemático de los datos obtenidos en la qPCR en Tiempo Real se hizo de la siguiente manera: se calculó la media y la desviación estándar de los duplicados de las muestras para comprobar que no había problemas en ninguna de ellas y que los duplicados eran correctos. Con la media de cada muestra se calculó el valor ΔC_T (C_T gen de estudio - C_T gen *house-keeping*), para normalizar este valor con respecto a la referencia establecida por el *house-keeping*.

Para detectar cambios en la expresión de los genes, se comparó su ΔC_T con el de las muestras tratadas con el medio que funcionó como control negativo a cada tiempo. Así, se calculó el valor $\Delta\Delta C_T$, restando la media del valor ΔC_T de las muestras tratadas con medio control a las 4 y a las 8 horas a los valores ΔC_T de las muestras tratadas con medio con colesterol vehiculizado en LDL o en etanol.

Finalmente, para representar los datos de forma comparable, se calculó la potencia $R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$. Este valor es una representación de cuántas veces más se ha amplificado el gen de estudio en la muestra analizada con respecto al número de copias que tiene la muestra tratada con el medio control.

Resultados y discusión

Aislamiento de LDL

Como se ha explicado, los dos métodos considerados para el aislamiento de LDL fueron la ultracentrifugación en gradiente de densidad y la separación por FPLC:

Ultracentrifugación en gradiente de densidad

En un principio se eligió seguir el protocolo de Vieira et al. (4) puesto que en él, el tiempo de ultracentrifugación era más breve que en otros protocolos y se describía que las preparaciones de LDL obtenidas presentaban la misma calidad que las separadas a tiempos de ultracentrifugación más largos.

Como se ha comentado, se hizo un paso previo a la ultracentrifugación de tratamiento con carbón activo. Se esperaba facilitar con esto la posterior deslipidización de las LDL por la absorción del colesterol no adherido a ellas, así como la retirada de sustancias adicionales del suero tales como hormonas. Sin embargo, partiendo de 10 ml de plasma, este tratamiento redujo el volumen a la mitad y aunque sería necesario comprobarlo, probablemente eliminó parte de las lipoproteínas. Además, implicaba más tiempo de trabajo que no suponía ventajas lo suficientemente importantes como para seguir aplicándolo en posteriores pruebas, por lo que no se volvió a realizar.

La recogida de la fase correspondiente a las LDL tras la ultracentrifugación no fue sencilla. Esta quedaba posicionada muy cerca de la fase correspondiente a las VLDL, por lo que al extraer las LDL era muy fácil tomar parte de la fracción de VLDL, contaminando la preparación. Se recogieron 4 ml de LDL.

Por FPLC se pudo comprobar que el perfil de elución de la fracción de LDL separadas correspondía, efectivamente a este tipo de lipoproteínas. Sin embargo, no aparecía un único pico en el cromatograma, se apreciaba un pico de menor tamaño que aparecía antes que el correspondiente a las LDL, por lo tanto estas no se habían conseguido purificar por completo, se tenía contaminación por VLDL.

Previo a cargar la columna para realizar la cromatografía, hubo que concentrar las muestras con el método de centrifugación descrito. Además, este paso fue necesario para eliminar la sal (KBr) añadida para ajustar la densidad del plasma antes de la ultracentrifugación. Dicha sal podría dañar la columna y además, de no retirarla por completo de la preparación de LDL, podría resultar tóxica para las células al administrar el tratamiento con colesterol vehiculizado en las lipopartículas. Tras la centrifugación se recuperaron unos 900 µl de LDL.

Cromatografía líquida rápida de proteínas, FPLC

Tal y como se ha descrito, para hacer la valoración de esta separación se cargaron 300 µl de plasma diluido 1:2 con PBS. Tras la elución de la columna con PBS se recuperaron las fracciones correspondientes a las LDL identificadas en el cromatograma del ordenador.

Estas fracciones se juntaron y se sometieron al sistema de concentración de las muestras, tras el cual se recuperaron unos 500 µl de preparación de LDL. Este aparente mayor volumen de LDL que de plasma cargado inicialmente en la columna se explica porque, a pesar del paso de concentración de muestras, esta se encontraba muy diluida tras la elución. Para las siguientes separaciones se decidió no diluir el plasma al cargarlo en la columna, de manera que se obtuvieran preparaciones más concentradas.

Para estudiar las características de la preparación de LDL recuperadas se midió la concentración de proteína por el método de Bradford. La concentración obtenida fue de 0,92 µg/µl. También se midió la concentración de colesterol por fluorescencia, obteniendo un valor de 113,15 µM (437,55 mg/dl).

En vista de estos resultados, se hizo la siguiente valoración:

- El protocolo de ultracentrifugación necesitaba ser optimizado para conseguir una mejor separación de las LDL y las VLDL, lo cual implicaría mayor tiempo de centrifugación. Además necesitaba la adición de KBr para crear el gradiente, una sal que resultaría tóxica para las células siendo necesario retirarla de la preparación antes de realizar los ensayos. Aun haciendo esto, existiría riesgo de que la eliminación no fuera total y algo de KBr llegara a las células.
- La separación por FPLC permitía la obtención de una fracción de LDL de concentración de proteína y colesterol adecuadas para los experimentos posteriores, siendo posible obtener preparaciones más concentradas simplemente cargando el plasma sin diluir en la columna. Las LDL separadas por este sistema podían estar contaminadas por HDL al eluir estas en fracciones próximas a las LDL.

En vista de las ventajas y desventajas descritas para cada método y a pesar de no haber medido la concentración de proteína ni de colesterol de la preparación de LDL obtenida por ultracentrifugación y por tanto no poder comparar con la de la preparación obtenida por FPLC, se consideró que este último sistema era más sencillo de aplicar, ocupaba menos tiempo y requería menos trabajo que la ultracentrifugación. Además, el riesgo de contaminación por HDL utilizando este sistema es menor que el riesgo de contaminación por VLDL al separar las LDL por ultracentrifugación.

Así, los siguientes experimentos se realizaron separando las LDL por FPLC.

Conservación de LDL a distintos tiempos

Los dos métodos de conservación que se estudiaron fueron, como se ha comentado, la criopreservación con sacarosa, y la liofilización utilizando almidón como agente crioprotector.

Para evaluar la conservación de las LDL con cada uno de los dos métodos a distintos tiempos, se volvieron a cargar en el FPLC estas preparaciones y se analizó el cromatograma obtenido en cada caso, comparándolo con el de una preparación de LDL recién aisladas por FPLC.

Estos fueron los resultados:

** Sobre los cromatogramas presentados es importante comentar que lo único que pretenden reflejar es la fracción a la que comienzan a eluir las LDL; la altura (absorbancia) de los picos no está representada en la misma escala en las tres muestras representadas en cada gráfica y por tanto no es comparable, de manera que el que un pico sea mayor que otro no implica que haya más cantidad de proteína en dicha preparación.*

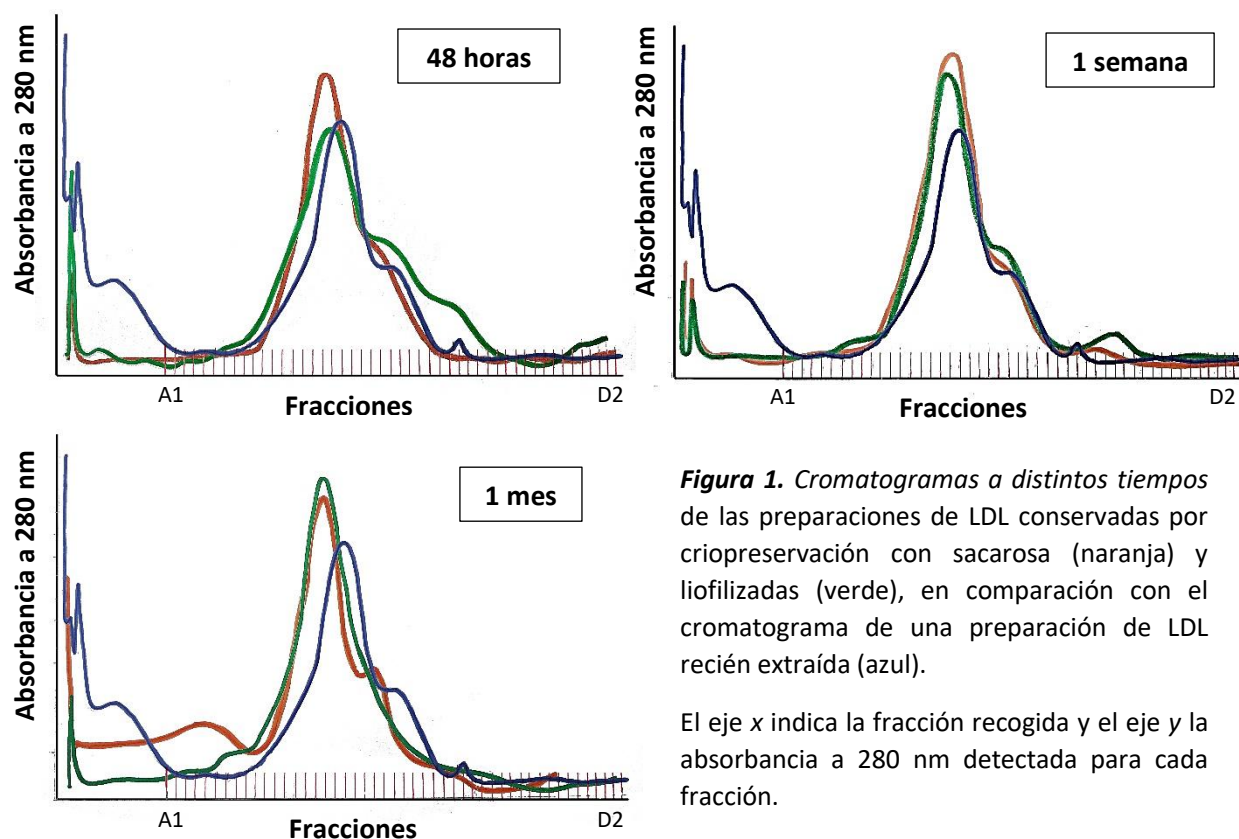


Figura 1. Cromatogramas a distintos tiempos de las preparaciones de LDL conservadas por criopreservación con sacarosa (naranja) y liofilizadas (verde), en comparación con el cromatograma de una preparación de LDL recién extraída (azul).

El eje x indica la fracción recogida y el eje y la absorbancia a 280 nm detectada para cada fracción.

El pico correspondiente a las LDL es el pico central más grande, la parte del perfil representada antes de la primera fracción (A1) no es importante, corresponde a la absorbancia del eluido previo a que la muestra entre en la columna y comience a separarse en fracciones.

Todos los perfiles presentan un hombro a la derecha, lo cual indica cierta contaminación por HDL. En el perfil de la muestra conservada con sacarosa durante un mes aparece un pico de menor intensidad a la izquierda del pico principal correspondiente a las LDL. Esto puede deberse a contaminación por VLDL o quilomicrones, por lo que en esta preparación no hubo un aislamiento adecuado de las LDL.

Observando las gráficas se puede apreciar que, en todos los casos, los perfiles de las muestras conservadas por cualquiera de los dos métodos aparecen ligeramente desplazados a la izquierda: empiezan a eluir antes que las LDL recién separadas. Esto indica que puede haber cierto grado de degradación en dichas muestras. Sin embargo el desplazamiento no es muy acusado y se puede decir que las preparaciones se han conservado adecuadamente, incluso pasado un mes desde su aislamiento.

Tal y como sería esperable, el desplazamiento es mayor cuanto más tiempo ha pasado desde el aislamiento de las LDL. Así, las muestras conservadas 48 horas apenas han sufrido degradación, pasada una semana el desplazamiento es mayor, y pasado un mes se da un mayor desplazamiento y por tanto más degradación.

No hay diferencia significativa entre el desplazamiento por degradación que experimentan las LDL liofilizadas y las LDL conservadas con sacarosa, el máximo del pico de elución aparece en la misma fracción para ambas, por lo que no es posible determinar con los ensayos realizados qué método conserva mejor las LDL. Sería necesario llevar a cabo más pruebas a tiempos más largos con objeto de encontrar diferencias reseñables.

Dado que ninguno de los dos métodos parece conservar las preparaciones mejor que el otro, al menos según los ensayos realizados, la decisión de conservar las LDL por liofilización se basó en el compuesto crioprotector a añadir. Se asumió que, a pesar de someter las preparaciones de LDL al proceso de concentración por centrifugación antes de incorporarlas a las células, una parte del mismo llegaría a ellas.

La sacarosa es un compuesto bioactivo que si se administra a las células puede desencadenar una respuesta inespecífica que interfiera en la expresión de los genes que se van a estudiar por qPCR en Tiempo Real. Por el contrario, el almidón es una molécula más compleja que no va a ser incorporada tan fácilmente como la sacarosa, por lo que la posible interferencia del mismo sería menor. Además la cantidad añadida en proporción es mucho menor que la de sacarosa.

Por tanto, a pesar de que la recuperación de las muestras liofilizadas exige la incubación con tricina durante al menos 12 horas prolongando así el tiempo de trabajo, se decidió que este sistema de conservación era mejor para continuar con los experimentos que la criopreservación con sacarosa.

Deslipidización parcial de las LDL y vehiculización del colesterol

Como se ha adelantado en la sección “Materiales y Métodos”, no fue posible lograr la deslipidización de las LDL aisladas por FPLC. Los resultados de concentración de proteína y colesterol de las preparaciones de LDL sometidas al proceso de deslipidización tras cada una de las pruebas que se hicieron fueron los siguientes:

Prueba	Muestra		Concentración de proteína (µg/ml)	Concentración de colesterol (µM)
1	A	A	159,84	No se obtuvo señal
		A*	357,66	
2	B	B*	857,19	24,49
3	C	C	403,00	1600
		C*	44,42	250
4	D	D	862,7	22,39
	E	E*	954,04	22,61

Tabla 1. Resultados de las pruebas de deslipidización. Las casillas sombreadas en azul y las muestras con asterisco indican que a dicha muestra se le añadió oleato de colesterol, mientras que las casillas sin sombreado corresponden a muestras deslipidizadas utilizadas como control negativo.

Lo primero que llama la atención de estos resultados es la concentración de proteína tan distinta medida en las muestras que se dividieron en dos alícuotas en el paso final de la deslipidización.

Esto se explica por la dificultad a la hora de hacer una división exacta a partir de las muestras sometidas a este proceso, puesto que la división se hizo o bien cuando las LDL se encontraban precipitadas o bien cuando estas estaban resuspendidas en heptano (se mantenían muy poco tiempo en suspensión). En ambos casos separar de manera precisa tal preparación resultó muy complicado, la división se hizo mediante una estimación visual de las cantidades y como se puede comprobar, fue muy imprecisa. Sería necesario optimizar una forma de hacer la separación de manera exacta, por ejemplo pesando la cantidad de muestra.

Esta explicación es corroborada por las medidas de concentración de proteína más similares en las muestras que se mantuvieron íntegras tras la deslipidización (B, D, E).

En cuanto a la concentración de colesterol, en la Prueba 1 no se detectó señal porque se utilizó un método distinto, menos sensible para la determinación. Al ver que no se obtenía señal se decidió utilizar el kit Amplex Red Reagent Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU)

para la realización de la determinación de la concentración por fluorescencia en las siguientes pruebas, tal y como se describe en la sección “Materiales y Métodos”.

Por otro lado, se puede ver que en la tercera prueba, la concentración de colesterol de la muestra C (la de ambas alícuotas obtenidas a partir de esta), es de hasta dos órdenes de magnitud mayor que la concentración en las muestras B, D y E, aun siendo la concentración de proteína mucho menor que la de dichas muestras.

Dado que las concentraciones de colesterol en las muestras B, D y E se mantienen dentro de un rango similar, se dieron estas como válidas y se pensó que en la tercera prueba hubo alguna clase de problema en la determinación del colesterol. Pudo fallar alguno de los reactivos del kit, pudo contaminarse la placa, pudo haber algún error de pipeteo...

En cualquier caso, lo que se esperaba era que las preparaciones deslipidizadas sin adición de colesterol tuvieran una concentración menor de colesterol que aquellas a las que tras la deslipidización se les había añadido oleato de colesterol. Sin embargo, no es esto lo que se observa en los resultados. El que no haya una diferencia significativa entre ambas parece indicar que el método de deslipidización aplicado no funciona en las condiciones que se ensayaron. Sería necesario continuar optimizándolo, o tal vez ensayar uno distinto con otro solvente para realizar la extracción.

Por otro lado, también sería conveniente medir la concentración de colesterol antes de realizar la extracción con heptano, para comprobar si hay diferencia antes y después del tratamiento para la extracción de los lípidos neutros. Tal y como se hicieron las pruebas lo que se está comprobando en realidad es si las LDL captan el oleato de colesterol que se les añade, pero no se determina si la cantidad de colesterol de la preparación tras la deslipidización es menor que al principio. Este es un punto importante sobre el que intervenir para la mejora del trabajo.

Dado que no se pudo eliminar el colesterol de las LDL, fue imposible preparar un control de LDL sin colesterol para los experimentos realizados en las células HepG2. Por ello, como control negativo para el tratamiento con colesterol vehiculizado en LDL fue necesario utilizar el mismo control negativo que el empleado para el tratamiento con colesterol vehiculizado en etanol: etanol al 0,25 % en medio DMEM sin glucosa.

Tratamiento con colesterol de las células HepG2

Tras el tratamiento con los medios descritos en la sección “Materiales y Métodos” se extrajo el RNA y este se retrotranscribió a cDNA, material de partida para la qPCR en Tiempo Real.

Con los valores C_T (ciclo en el que comienza la emisión significativa de fluorescencia) de cada muestra amplificada con los cebadores específicos del gen a estudiar en dicha muestra, se calculó la expresión diferencial de cada gen utilizando como referencia *PP1B*. Este gen funciona como *gen de referencia o house keeping*: se expresa de manera constitutiva en las células HepG2 y se sabe que no varía en las condiciones ensayadas.

Tras el análisis matemático, los valores de potencia obtenidos fueron analizados con el programa GraphPad Prism5. Por tener más de una condición experimental a estudiar se aplicó el test one way ANOVA, con objeto de buscar diferencias significativas. Se obtuvieron las siguientes gráficas:

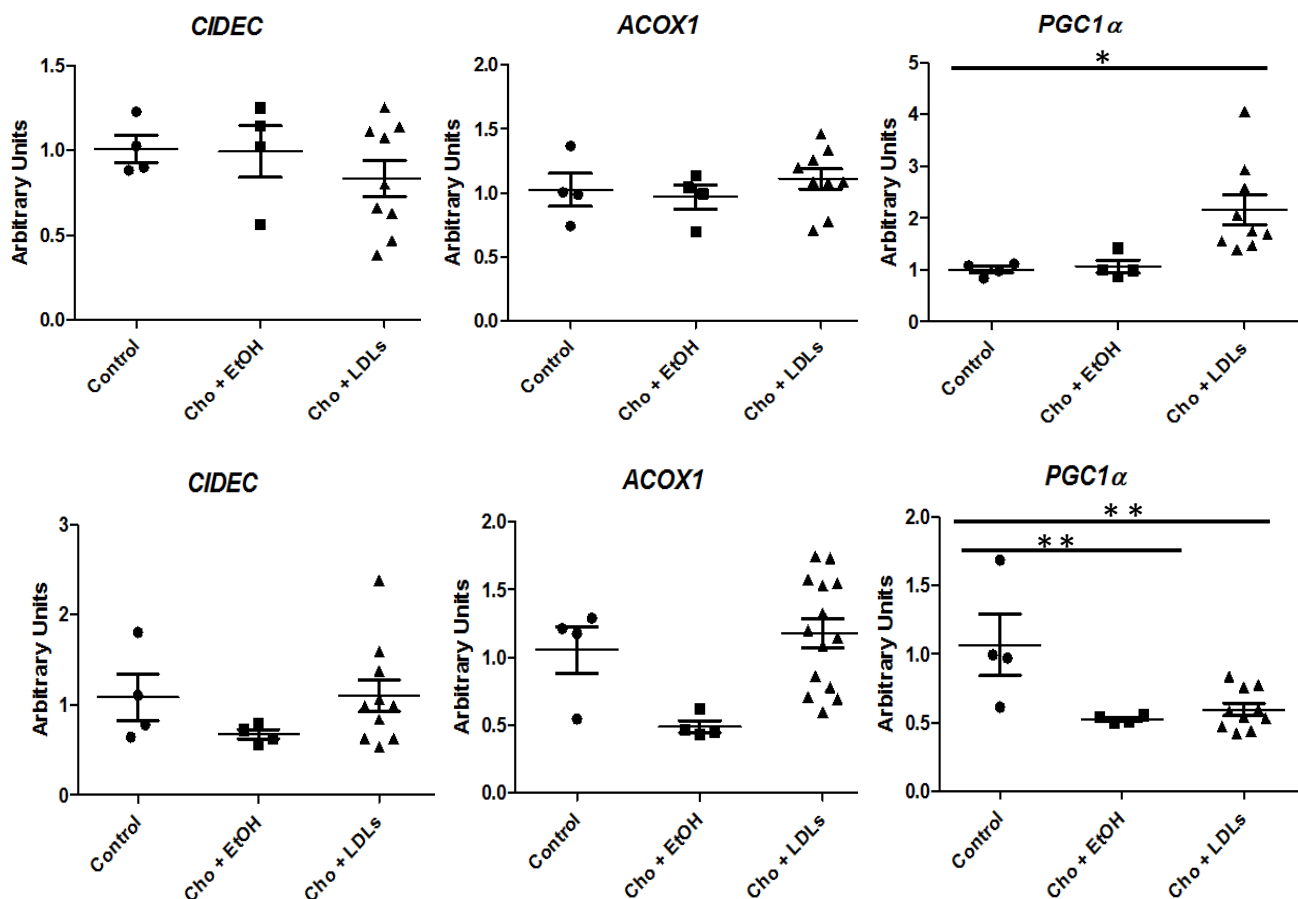


Figura 2. Expresión diferencial de los genes de estudio a las 4 horas (arriba) y a las 8 horas (abajo) según el medio de tratamiento ensayado en las células HepG2. Las unidades del eje y son arbitrarias. En el eje x: Control (células tratadas con 0,25 % de etanol), Cho + EtOH (células tratadas con colesterol vehiculizado en etanol), Cho + LDLs (células tratadas con colesterol vehiculizado en LDL) **, P < 0,001 según ANOVA

Por otro lado se valoró la posible correlación en la expresión de los genes estudiados con el programa SPSS aplicando el test de correlación de Pearson. Se obtuvieron los siguientes resultados:

		PGC1A	FSP27	ACOX1
PGC1A	Correlación de Pearson	1	-,156	,101
	Sig. (bilateral)		,371	,564
	N	35	35	35
FSP27	Correlación de Pearson	-,156	1	,684(**)
	Sig. (bilateral)	,371		,000
	N	35	35	35
ACOX1	Correlación de Pearson	,101	,684(**)	1
	Sig. (bilateral)	,564	,000	
	N	35	35	35

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 2. Análisis de las correlaciones de la expresión de los distintos genes

Uno de los resultados del tratamiento que interesaba estudiar era el efecto de administrar el colesterol vehiculizado en LDL o vehiculizado en etanol. Se cree que la administración en un vehículo o en otro activará rutas metabólicas distintas en la célula, desencadenando distintas respuestas que podrían afectar a la expresión de los genes de estudio.

PGC1 α

Tal y como se ve en las gráficas, el gen estudiado que experimentó diferencias significativas en la expresión fue *PGC1 α* , que como se ha dicho es un coactivador de múltiples rutas relacionadas con el metabolismo energético:

- Cuando las células son tratadas con colesterol vehiculizado en LDL, a las 4 horas este gen aparece sobreexpresado con respecto al control y a las células tratadas con colesterol vehiculizado en etanol.
- A las 8 horas este efecto ha desaparecido y las células tratadas con colesterol administrado por cualquiera de los dos vehículos disminuyen la expresión de *PGC1 α* por debajo del nivel de expresión del mismo en el control a las 8 horas. Esta diferencia es muy significativa.

Es lógico que la expresión de este gen sea inducida rápidamente en respuesta a un determinado tratamiento y pueda apreciarse respuesta a las 4 horas, porque se trata de un regulador del metabolismo que inicia respuestas ante determinadas condiciones ambientales en la célula. El que la expresión a las 4 horas solo aumente en el caso de las células tratadas con colesterol vehiculizado en LDL y no en el control ni en las tratadas con colesterol en etanol, indica que es un efecto del vehículo. Esto quiere decir que las células responden a las LDL, posiblemente las captan y las internalizan y esto desencadena una serie de señales que inducen la sobreexpresión de *PGC1 α* . Estas señales no se dan en el caso del colesterol vehiculizado en etanol, por lo que se deduce que este no se internaliza de la misma manera.

A las 8 horas el efecto del vehículo deja de ser apreciable, puesto que la expresión del gen disminuye de la misma manera en las células tratadas con colesterol, sea cual sea el vehículo, quedando a niveles por debajo de la expresión en el control. Esto puede deberse a que la respuesta al tratamiento es rápida y a las 8 horas ya no es tan importante, al haberse activado ya los factores de transcripción que se inducen por la expresión de *PGC1 α* .

Hay que reseñar que las células HepG2, una línea celular humana, respondieron a las LDL aisladas de plasma de cerdo, por lo que estas lipoproteínas, a pesar de provenir de otra especie, parecen servir como vehículo de colesterol. Esto abriría la posibilidad de utilizar LDL de cerdo como vehículo para la administración de colesterol a células humanas, puesto que tal y como parece indicar este experimento, pueden ser internalizadas y desencadenar respuestas. Para continuar con esta línea experimental sería necesario hacer más ensayos en los que se comparara la respuesta desencadenada por cada tipo de LDL.

ACOX1 y CIDEA

En la expresión de *ACOX1* y *CIDEA* no hay diferencias significativas en respuesta al tratamiento. Sin embargo se puede comentar que, en el caso de *ACOX1*, a las 8 horas en las células tratadas con colesterol vehiculizado en etanol, parece haber una disminución ligera en su expresión con respecto al control y a las tratadas con colesterol en LDL. *ACOX1* es la primera enzima de la β -oxidación en el peroxisoma. Si disminuye su expresión se degradan menos ácidos grasos de cadena larga y al final la célula produce menos energía. Este efecto solo parece darse al vehiculizar el colesterol en etanol, por lo que puede que este modo de vehiculización active rutas

que lleven a la inhibición de la expresión de la enzima que no se activan si se vehiculiza en LDL o al menos, no a ese tiempo.

En cuanto a *CIDEA*, aparentemente no hay respuesta al tratamiento ni a las 4 ni a las 8 horas. Este gen, que codifica para una proteína relacionada con la formación de las gotas lipídicas y la disminución de la velocidad de oxidación de los ácidos grasos, parece tener una respuesta más lenta al tratamiento que los otros dos genes estudiados.

Por otro lado, con el test de correlación de Pearson se pudo apreciar que existe una correlación positiva significativa en la expresión de *CIDEA* (o *FSP27*) y *ACOX1*. Como se ha comentado, *ACOX1* codifica para la primera enzima de la β -oxidación de los ácidos grasos, y *CIDEA* para *FSP27*, proteína que al sobreexpresarse hace que la velocidad de la oxidación de los ácidos grasos disminuya.

Podría parecer ilógico que genes con funciones contrarias presenten una correlación positiva, sin embargo, esto puede deberse a un mecanismo de regulación de la oxidación de ácidos grasos en varias etapas, por el que la sobreexpresión de *FSP27* desencadena inicialmente la sobreexpresión de *ACOX1*, de manera que, al encontrarse la expresión de *ACOX1* por encima de un determinado umbral, se ponen en marcha mecanismos de regulación secundarios que controlan su expresión y acaban provocando su inhibición y consecuente disminución de la velocidad de oxidación de los ácidos grasos. Esta posible explicación asume que la correlación positiva solo se da a tiempos de inducción tempranos, invirtiéndose con el paso del tiempo.

Conclusiones

Como conclusiones extraídas de los ensayos realizados en este trabajo se puede decir que:

- La separación por FPLC de las LDL plasmáticas permite obtener preparaciones de una calidad adecuada, aunque existe riesgo de contaminación por HDL.
- La separación por ultracentrifugación en gradiente de densidad de LDL presenta un mayor riesgo de contaminación por otras lipoproteínas, en concreto, VLDL. Además la necesidad de utilizar KBr para crear el gradiente de densidad supone un problema a la hora de realizar experimentos posteriores con células (es tóxico).
- Los métodos de conservación de las preparaciones de LDL analizados (la criopreservación con sacarosa y la liofilización) no presentan diferencias en cuanto al mantenimiento de las muestras, al menos en los tiempos a los que se compararon.
- El método de deslipidización ensayado necesita ser optimizado, puesto que no se consiguió la eliminación de los lípidos neutros de las muestras tratadas.
- La vehiculización de colesterol en LDL tiene un efecto significativo y diferencial a las 4 horas sobre la expresión de *PGC1 α* en las células HepG2 con respecto al control y a la vehiculización de colesterol en etanol. Por tanto, la administración de colesterol en distintos vehículos es capaz de producir efectos diferentes en la expresión génica de las células HepG2.
- Existe correlación en la expresión de los genes *ACOX1* y *CIDEA* en las células HepG2. Esto podría explicarse con una ruta de regulación de la oxidación de los ácidos grasos teórica que implicara a ambos genes.

Conclusions

As a consequence of the essays conducted in this project, it can be said that:

- FPLC LDL isolation provides good quality preparations, even though there is a risk of HDL contamination.
- Density gradient ultracentrifugation LDL isolation presents a higher risk of contamination by other lipoproteins, specifically VLDL. Also, the requirement of KBr use in order to create the density gradient, implies a problem due to its toxicity when administrated to cells in later experiments.
- Methods for conservation of the preparations of LDL analysed in this project (cryopreservation with sucrose and lyophilization) do not present any differences in regards of samples maintenance, at least at the times compared in these experiments.
- Delipidization method essayed needs to be optimized, due to the fact that it was not possible to remove all neutral lipids in treated samples.
- Vehiculization of cholesterol in LDL has a significant and differential effect after 4 hours treatment on *PGC1 α* expression in HepG2 cells compared to its expression in cells treated with control and ethanol vehiculization of cholesterol. Consequently, cholesterol administration in different vehicles is able to induce dissimilar effects on genetic expression in HepG2 cells.
- There is a correlation in *ACOX1* and *CIDEA* genes expression in HepG2 cells. This could be explained with a theoretical regulation pathway of fatty acid oxidation, which involved both genes.

Bibliografía

1. Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: From plaques to genes to statins. *Cell*. 2015;161(1):161–72.
2. Krieger M, McPhaul MJ, Goldstein JL, Brown MS. Replacement of neutral lipids of low density lipoprotein with esters of long chain unsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 1979;254(10):3845–53.
3. Errico TL, Chen X, Martin JM, Julve J. Mecanismos básicos : estructura , función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. 2013;25(2):98–103.
4. Vieira O V, Laranjinha JA, Madeira VM, Almeida LM. Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *J Lipid Res*. 1996;37(12):2715–21.
5. Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM, et al. [8] Single Vertical Spin Density Gradient Ultracentrifugation. *Methods Enzymol*. 1986;128(C):181–209.
6. Melchior JT, Sawyer JK, Kelley KL, Shah R, Wilson MD, Hantgan RR, et al. LDL particle core enrichment in cholesteryl oleate increases proteoglycan binding and promotes atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2013;54(9):2495–503.
7. Madadlou A, O’Sullivan S, Sheehan D. Fast protein liquid chromatography. *Methods Mol Biol*. 2011;681:439–47.
8. Rumsey SC, Galeano NF, Arad Y, Deckelbaum RJ. Cryopreservation with sucrose maintains normal physical and biological properties of human plasma low density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1992;33(10):1551–61.
9. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, et al. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids 1a,b,c,d. *J Am Chem Soc*. 1946;68(3):459–75.
10. Lovelock JE 1957. The denaturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc R Soc (Ser B)*. 1957;147:427–33.
11. Starciuc T, Guinet Y, Paccou L, Hedoux A. Influence of a Small Amount of Glycerol on the Trehalose Bioprotective Action Analyzed In-Situ During Freeze-Drying of Lysozyme Formulations by Micro-Raman Spectroscopy. *J Pharm Sci*. 2017;104:170–8.
12. Tang X, Pikal MJ. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharm Res*. 2004;21(2):191–200.
13. Gustafson A. New method for partial delipidization of serum lipoproteins. *J Lipid Res*. 1965;6:512–7.
14. Cox DC, Comai K, Goldstein AL. Effects of cholesterol and 25-hydroxycholesterol on smooth muscle cell and endothelial cell growth. *Lipids*. 1988;23(2):85–8.
15. Way OM. A novel cholesterol / lipid delivery system for murine myeloma cell lines. *Biotechnol Prog*. 2017;33(3):795–803.
16. Daragan V a, Voloshin a M, Chochina S V, Khazanovich TN, Wood WG, Avdulov N a, et al. Specific binding of ethanol to cholesterol in organic solvents. *Biophys J*.

2000;79(1):406–15.

17. Bouma, M. E., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C. & Feldmann G. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: Morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *Vitr Cell Dev Biol.* 1989;25:267–75.
18. Hart SN, Li Y, Nakamoto K, Subileau E, Steen D, Zhong X. A Comparison of Whole Genome Gene Expression Profiles of HepaRG Cells and HepG2 Cells to Primary Human Hepatocytes and Human Liver Tissues. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(6):988–94.
19. Kurano M, Iso-O N, Hara M, Ishizaka N, Moriya K, Koike K, et al. LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. *Lipids Health Dis.* 2011;10(1):134.
20. Vila-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Goncalves JF, Haro D, Marrero PF. Fsp27/CIDEA is a CREB target gene induced during early fasting in liver and regulated by FA oxidation rate. *J Lipid Res.* 2013;54(3):592–601.
21. Jiao Y, Zan LS, Liu YF, Wang HB. Molecular characterization, polymorphism of the ACOX1 gene and association with ultrasound traits in *Bos taurus*. *Genet Mol Res.* 2011;10(3):1948–57.
22. Jäger SS, Handschin CC, St-Pierre JJ, Spiegelman BMBM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad USA.* 2007;104(29):12017–22.
23. Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20(2):98–105.

Anexo

Secuencias de los cebadores de la QPCR en Tiempo Real

Estas son las secuencias de los primers utilizados para la QPCR en Tiempo Real de acuerdo a las guías MIQE:

Símbolo del gen	Código de acceso		Secuencia	Amplicón	Posición	Concentración	Eficiencia
PPIB	NM_000942.4	Directo	CGAG TCGT CTTT GGAC TCTT TG	182 nt	Exón 2-3	100 nM	90%
		Reverso	TAGATGCTCTTTCCTCCTGTGC				
FSP27	NM_001199623.1	Directo	GGGATACAGTGTCATGGTCCT	108 nt	Exón 4-5	85 nM	105%
		Reverso	TCAATCTTCTTGGCAGGCTTATG				
PGC1A	NM_001330751.1	Directo	GTGTTCCCGATCACCATATTCC	152 nt	Exón 11-13	100 nM	93%
		Reverso	AGGGTGACCTTGAACGTGATCT				
ACOX1	NM_004035.6	Directo	GCCTGAGCCTCTGGATCTTC	495 nt	Exón 3-6	200 nM	103%
		Reverso	GGCTTCACCTGGGCATACTT				